

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06982

研究課題名（和文）Bcor遺伝子構造異常とゲノム修飾の関係

研究課題名（英文）Bcor gene abnormality and genomic modifications

研究代表者

上野 瞳（Ueno, Hitomi）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・上級研究員

研究者番号：30435630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：BCOR遺伝子内縦列重複変異と腫瘍に特徴的な遺伝子発現変化やDNAメチル化修飾変化の関係を明らかにすることを目的として本研究を行った。腫瘍におけるこの変異は活性化X染色体に生じたものと推測されるが、本研究により、BCOR遺伝子の発現増加とプロモーター領域のDNA低メチル化は変異獲得により生じた可能性が高いことが明らかとなった。さらにこの変異はマウスES細胞の未分化性の維持には影響を及ぼさないが、分化段階では影響があることが明らかとなった。変異マウスの系統樹立を行い、その表現型については他のBcor変異マウスとの相違を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はゲノム編集により作成したBcor縦列重複変異細胞を用いていることで、より腫瘍に近いゲノム構造で生じる遺伝子発現変化やDNAメチル化修飾変化を解析、さらに変異マウスの系統樹立を行った。本研究の成果により、Bcor縦列重複変異の特性の一部が明らかとなり小児がんの診断や治療において学術的意義が高いと考える。また、Bcorはポリコム複合体の構成因子であることから、エピジェネティクス分野や再生医療分野においても本研究が新たな知見をもたらすものと思われる。

研究成果の概要（英文）：We performed this study to clarify the relation between the BCOR internal tandem duplication (BCOR-ITD) and the changes in gene expression and DNA methylation characteristic of tumors. This study revealed that the increased expression of the BCOR gene and DNA hypomethylation in Bcor promoter region likely resulted from the acquisition of the mutation. Furthermore, we revealed that although Bcor-ITD mutant mouse ES cells were viable and retained normal self-renewal, they displayed severe defects in differentiation in vitro. Additionally, we generated the mutant model mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん DNAメチル化 Bcor

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

BCOR は BCL6 と共に血液細胞の分化に関与する遺伝子として発見され、BCL6 結合不全を引き起こすナンセンス変異やフレームシフト変異による BCOR 機能喪失変異は成人における血液腫瘍において良く知られていた。一方で小児においては、血液腫瘍、固形腫瘍分野ともに、BCOR 遺伝子は注目されていなかった。研究代表者らは、小児腎腫瘍である腎明細胞肉腫(CCSK)において、BCOR internal tandem duplication (BCOR-ITD)変異を、世界で初めて発見し報告した。CCSK は、他国から一部の症例において染色体転座による融合遺伝子(YWHAE-NUTM2)が報告されていたものの、染色体異常や遺伝子変異が非常に少ない特徴があり、共通した変異の発見には至っていなかった。研究代表者らは、DNA メチル化修飾解析の結果から、エピゲノム関連因子に着目し、本邦20症例全例に共通する BCOR-ITD 変異の発見に至った。その後の数々の後発論文においても、CCSK の約90%が BCOR-ITD 変異を有すると報告され、現在では BCOR-ITD 変異が common feature であるという見解に至っている。

この変異は、BCOR の C 末端にある non-canonical polycomb repressive complex 1 (nc-PRC1) の形成に重要な PUFD domain 内に生じており、何らかのエピゲノム修飾異常が腫瘍形成に関与しているものと予想された。それは、Infinium27K による DNA メチル化解析において、他の小児腎腫瘍に比べて CCSK の DNA メチル化がゲノム全体にわたり非常に特徴的な高メチル化修飾を受けていたことから、推測可能である。BCOR-ITD 変異は、BCL6 結合ドメインは保存され、BCOR-ITD タンパクとして過剰発現が認められることから、既知の機能喪失変異とは機能的に異なることが予想される。さらに、現在 BCOR-ITD 変異は、これまで既知の遺伝子変異がなく診断が困難であった小児の未分化肉腫や一部の脳腫瘍において、さらに成人の肉腫においても報告がなされ、固形腫瘍の診断や腫瘍発症における BCOR 発現の意義において益々注目されつつある。

腫瘍の研究において、腫瘍由来の細胞株や腫瘍組織そのものの解析が最も良い研究材料であるが、小児腫瘍全体数に対し BCOR-ITD 変異腫瘍の割合は非常に少なく、腫瘍細胞の株化の報告はない。加えて、培養可能な状態で腫瘍を得ることは非常に困難であることから、我々はこれまでの研究でゲノム編集による Bcor-ITD 変異細胞の樹立を行った。その細胞やモデル生物の作出・解析を通じて腫瘍で認められる特徴的な遺伝子発現やエピゲノム修飾と Bcor-ITD 変異の関係について明らかにすることで、BCOR-ITD 変異による腫瘍の発症機序の解明や治療法開発へ貢献できるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、我々がこれまでにゲノム編集で作成した Bcor-ITD 変異マウス線維芽細胞・マウス ES 細胞の解析を主として行い、腫瘍で認められる BCOR-ITD の過剰発現やエピゲノム修飾変化・遺伝子発現変化が Bcor-ITD 変異獲得に起因するかどうかを明らかにすることを目的とする。

さらに受精卵のゲノム編集による Bcor-ITD マウス作成は、フレームシフトが生じやすいため胚性致死や血液腫瘍が発生し系統維持が困難であったが、Bcor-ITD 変異 ES 細胞を樹立しているため、その ES 細胞を用いた Bcor-ITD マウスの系統樹立を試みる。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集マウスより樹立した細胞の網羅的遺伝子発現解析

Bcor-ITD 変異マウス胚性線維芽細胞

温度感受性 SV40 large T による不死化細胞として樹立した Bcor-ITD 変異(XXヘテロ)の胚性線維芽細胞を解析に使用した。X 染色体の活性化状態により、野生型 Bcor 発現株と Bcor-ITD 発現株とした。各々の4株について次世代シーケンサーによる RNA sequencing 解析を実施した。

Bcor-ITD 型マウス ES 細胞

正常核型であることを確認している、Bcor-ITD 変異(XXヘテロおよび XY)マウス ES 細胞、さらに同時に樹立した野生型 ES 細胞(XX, XY)を用いて、RNA sequencing 解析を行った。

(2) Bcor-ITD 変異マウス ES 細胞の分化能

Embryoid Body (EB)形成および遺伝子発現の比較

前述の ES 細胞を用いて、野生型と変異型の EB 形成能を比較した。EB 形成能については EB のサイズで評価した。

EB における遺伝子発現

Bcor-ITD 変異(XY)EB、野生型(XY)EB について、RNA sequencing 解析を行った。

(3) ゲノム編集マウスより樹立した細胞の DNA メチル化解析(研究代表者)

Bcor-ITD 型マウス胚性線維芽細胞

野生型発現クローンと Bcor-ITD 発現クローンの Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) によるメチル化解析を行った。

Bcor-ITD 型マウス ES 細胞

野生型発現クローンと ITD 発現クローンの RRBS によるメチル化解析を行った。

(4) ES 細胞からの Bcor-ITD マウスの系統樹立

Bcor-ITD 変異(XY)のマウス ES 細胞を用いてキメラマウスを作成し、C57BL/6 マウスへの戻し交配による Bcor-ITD マウスの系統樹立を目指した。繁殖維持が困難な状況が発生したため、DBA2 マウスへの戻し交配も検討した。表現型に特徴が認められたため、それらを解析した。

4. 研究成果

(1) ゲノム編集マウスより樹立した細胞の網羅的遺伝子発現解析

Bcor-ITD 変異マウス胎児線維芽細胞

野生型発現株 4 株および Bcor-ITD 発現株 4 株について、RNA sequencing による遺伝子発現解析を行った。edgeR による DEGs の検出を試みたが、検出された遺伝子数は Bcor を含め 4 遺伝子のみであった。この結果は胎児線維芽細胞の不均一性を考慮すると当然の結果であると考えられる。しかしながら、Bcor の発現は Bcor-ITD 発現株で優位に増加する遺伝子として検出されたことから、変異獲得により Bcor 遺伝子における転写の活性化が生じていることが明らかとなった。

Bcor-ITD 変異マウス ES 細胞

Bcor-ITD 変異(XXヘテロおよび XY)マウス ES 細胞、さらに同時に樹立した野生型 ES 細胞(XX, XY)を用い、RNA sequencing による遺伝子発現解析を実施した。核型を区別せずに野生型と変異型の差を edgeR で解析した結果、Bcor を含め DEGs は検出されなかった。ES 細胞は、XX 型では両アレルが活性化状態にあるため、解析結果に影響を及ぼしている可能性は否定できないが、野生型 ES 細胞と Bcor-ITD 変異型 ES 細胞の細胞増殖速度や colony 形態、多能性を示すアルカリフォスファターゼ染色に差異がないことと矛盾せず、Bcor 遺伝子そのものが ES 細胞の自己複製に関与していない可能性を示唆する。

(2) Bcor-ITD 型マウス ES 細胞の分化能

Embryoid Body (EB)形成および遺伝子発現の比較

前述の ES 細胞を用いて、野生型と変異型の EB 形成能を 9 日間の経時的な EB の大きさで評価した。変異型 ES 細胞の EB 形成能は野生型に比べ低下していた。Bcor-ITD 変異(XY)ES 細胞では EB 形成 3 日目には有意な差を認め、その後の EB サイズの増大が観察されなかった。

EB における遺伝子発現

EB 形成 0、1、3、6、9 日目の Bcor-ITD 変異(XY)EB、野生型 EB について RNA sequencing による遺伝子発現解析を行った。クラスタリング解析、PCA 解析の結果、変異型 ES 細胞は明らかな分化の異常が認められた。

(3) ゲノム編集マウスより樹立した細胞の DNA メチル化解析

Bcor-ITD 変異マウス胎児線維芽細胞

野生型発現株 4 株および Bcor-ITD 発現株 4 株について、RRBS によるメチル化解析を行った。1000 bp の window でメチル化率を算出し、変異と野生型を比較したところ ($q < 0.05$)、メチル化値の差が 20% 以上ある promoter-TSS 領域が 176 領域(高メチル化: 88 領域、低メチル化 88 領域) 検出された。Bcor 遺伝子は約 80 kb 離れた 2 か所の TSS が知られており、この 2 か所の TSS 領域は両方とも Bcor-ITD 変異発現株の promoter-TSS 領域における有意な低メチル化として検出された 88 領域に含まれていた。これは、腎明細胞肉腫で検出された低メチル化と一致していた。前述の遺伝子発現解析の転写産物ごとの集計結果からも、この 2 つの TSS から発現するバリエーションがともに増加しており、Bcor 遺伝子発現が DNA メチル化により制御されていることが示唆された。

Bcor-ITD 型マウス ES 細胞

Bcor-ITD 変異(XXヘテロおよび XY)マウス ES 細胞および野生型 ES 細胞(XX, XY)について、RRBS によるメチル化解析を行った。前述同様にメチル化率を算出し、変異と野生型を比較したが、メチル化値の差が 20% 以上ある promoter-TSS 領域は検出されなかった。マウス胎児線維芽細胞で検出された Bcor のプロモーター領域は、ES 細胞において、変異の有無に関わらず、低メチル化であった。

(4) ES 細胞からの Bcor-ITD マウスの系統樹立

Bcor-ITD 変異(XY)マウス ES 細胞を用いてキメラマウスを作成し、C57BL/6 マウスへの戻し交配を行った。Bcor-ITD 変異マウスは、全ての個体で尾が曲がっており、他の Bcor 変異マウスと同様の表現型を示した。作製した変異マウスはメス個体のみが生存可能であったが、そのメス個体においても野生型に比べ新生児死亡率が高い傾向にあった。戻し交配は二世代目で致死となり繁殖・維持が不可能となったため、現在は戻し交配の系統を DBA2 に変更して維持を行っている。

新生児死亡の原因を探るため死亡個体について、アルシアンブルーおよびアリザリンレッドによる二重染色透明骨格標本の作製を行い観察した。その結果、他の Bcor 変異マウスでは報告されていない異常が生じていることが明らかとなった。その異常は交配系統の変更後に死亡した仔マウスにも同様に認められ、系統に依存しない異常であり Bcor-ITD 変異による影響であることを強く示唆した。さらに、胎盤および胎仔の観察を行ったところ、発生中期から後期にかけて変異個体の胎盤組織に異常を認めた。特にオス個体の胎盤組織は、メス個体の胎盤組織よりも高度な異常が観察された。メス個体においては、ランダムな X 染色体不活化が生じていることと矛盾しない結果であり、胎盤の発達異常が Bcor-ITD マウスの高頻度な新生児死亡の要因の一つとなっているものと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野瞳、進導美幸、中里恵子、高田修治、寺尾美穂、阿久津英恵、津村秀樹、清河信敬、大喜多肇
2. 発表標題 Bcor-ITDマウスの胎仔および胎盤の観察
3. 学会等名 第65回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上野瞳、中里 恵子、高田 修治、 寺尾 美穂、 進導 美幸、 津村 秀樹、阿久津 英恵、清河 信敬、大喜多 肇
2. 発表標題 Bcor変異が発生に与える影響
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	進導 美幸 (Shindo Miyuki) (50866233)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・実験動物管理室・研究員 (82612)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大喜多 肇 (Okita Hajime) (50317260)	慶應義塾大学・医学部・准教授 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中林 一彦 (Nakabayashi Kazuhiko) (10415557)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・室長 (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関